

九州工業大学学術機関リポジトリ



Title	神経様細胞の凍結・融解特性に関する基礎的研究
Author(s)	植村, 真
Issue Date	2014-03-25
URL	http://hdl.handle.net/10228/5247
Rights	

氏 名	植村 真(東京都)			
学 位 の 種 類	博 士(工学)			
学 位 記 番 号	生工博甲第217号			
学位授与の日付	平成26年3月25日			
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当			
学位論文題目	神経様細胞の凍結・融解特性に関する基礎的研究			
論文審査委員会	委員長	教 授	玉川	雅章
		教 授	春山	哲也
		教 授	石黒	博
		教 授	花本	剛士
		教 授	鳥井	正史

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

神経細胞をターゲットとした薬剤のスクリーニングにおける細胞の準備では、現在、新鮮な懸濁状態の神経細胞や凍結保存された懸濁状態の神経細胞、新鮮な神経組織の切片が用いられている。懸濁状態の神経細胞の場合には、実験に使用する前に、分化誘導・神経突起伸長・神経ネットワーク形成の過程が必要となり煩雑である。神経ネットワークを形成した細胞や組織を、そのままの状態凍結保存することが出来れば、それらを用いたスクリーニングの大幅な効率化が期待できる。しかし、当該凍結保存については、これまであまり研究されていないため、未解明な点が多く、実用化もされていない。本研究では、神経ネットワークの構成要素である神経突起を有する神経細胞の凍結に関わる基礎的特性の理解を目的とし、基質に付着し神経突起を有する神経様細胞を作製・準備し、その凍結・融解特性を実験的に詳細に検討している。

第1章では、序論として、本研究の背景や目的などについて述べている。まず、本研究を理解する上で必要な基礎的事項として、細胞の凍結様式や凍結による細胞損傷、凍結保存の意義や方法などについて概説している。次いで、本研究で対象とする神経細胞の凍結保存に関する従来の研究を概観し、その問題点を明らかにした上で、本研究の位置付け、目的・内容、および、本論文の構成について述べている。

第2章では、本研究の実験材料である神経突起を有する神経様細胞（分化誘導したラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞株（PC12細胞））を効率的かつ安定的に準備するために、PC12細胞の増殖・分化特性を実験により定量的に調べ、分化率が最も高くなる条件を見出している。次いで、実験結果の現象論的検討に基づいて、未分化細胞の増殖と分化における細胞数の時系列変化の反応速度論的定式化による数学モデルを展開し、基礎方程式とその解析解を求めると共に、速度定数であるモデル定数のパラメータスタディにより、モデル特性を詳細に明らかにしている。さらに、本モデルと実験結果に基づいた逆問題解析からモデル定数を決定し、モデルによる計算値が実験値の特性を

良く模擬できることにより、モデルの妥当性を示している。また、本モデルで定義・提案した細胞の増殖・分化の速度定数は、細胞固有の特性値と見なせ、本モデルにより、細胞の増殖・分化特性を数学的に記述できることを示している。

第3章では、第2章の結果に基づいて準備した分化型PC12細胞に対して、まずは、細胞凍結の基礎的特性の把握のために、生理食塩水中での凍結挙動を調べると共に、凍結・融解後の形態変化と生存性を調べている。形態変化の形成機序の観点から、浸透圧ストレスの影響にも注目している。凍結様式は、従来研究されてきた種々の細胞の場合と同様に、冷却速度が低い場合には細胞外凍結であり、冷却速度の増加に従って、細胞内凍結の発生頻度が増加する傾向を示した。細胞外凍結では、細胞体と神経突起は、共に脱水・収縮・変形するのに対して、細胞内凍結は、細胞体で優先的に起こり、細胞内を伝播し、冷却速度の増加に対して、神経突起の根元から先端に向かう離れた位置まで氷結晶が及んだ。凍結・融解後の細胞には、必ずしも細胞の生死と関連なく、神経突起の数珠状化や短小化、細胞体の輪郭の不明瞭化などの形態変化が生じた。神経突起においては、細胞骨格の一種である中間径フィラメントにも同様の形態変化が生じた。以上の形態変化は、冷却速度にあまり依存性せず、最低到達温度の低下に対して助長される傾向を示した。また、神経突起は、塩化ナトリウムの等張から高張を経て等張へ戻る濃度変化に対しても、同様の形態変化を生じることから、浸透圧ストレスが凍結・融解後の細胞の形態変化に大きく影響することを示している。さらに、凍結・融解後の細胞の生存率は、冷却速度にあまり依存性せず、最低到達温度の低下と共に単調減少した。本実験では、生存率が変化する比較的高い最低到達温度の範囲に注目しているため、凍結様式は主に細胞外凍結であり、従って、本実験条件の範囲内では、細胞の形態変化や生存率の冷却速度依存性があまり顕著ではなかったと説明している。

第4章では、第3章で調べた凍結・融解特性に対する凍結保護物質添加の効果を明らかにするため、汎用的な細胞膜透過型凍結保護物質であるジメチルスルホキシドを10v/v%添加した生理食塩水中の分化型PC12細胞に対して、第3章と同様の検討を行っている。凍結・融解後の細胞の神経突起の数珠状化と短小化は、凍結保護物質を含まない生理食塩水中の場合に比べ、大きく軽減された。神経突起の細胞骨格に関しても、中間径フィラメントは、生理食塩水中の場合に比べ均一に分布し、未凍結状態の場合とほぼ同等の状態を示した。凍結・融解後の生存率も、凍結保護物質の添加により大幅に向上し、冷却速度に対して逆U字型の分布を示した。これは、凍結保護物質の添加により、細胞外の氷結晶の生成量が減少し、細胞内外の水溶液の濃縮による電解質濃度の増加が軽減され、浸透ストレスや細胞外の氷結晶からの機械的作用が緩和されたことによると説明している。

第5章では、結論として、第2章から第4章で得られた結果をまとめると共に、今後の発展的な課題について述べている。

学位論文審査の結果の要旨

本論文は、神経ネットワークを形成した細胞や組織の凍結保存を背景に、神経突起を有する神経

様細胞の凍結・融解特性に対して、熱的条件の影響や凍結保護物質添加の効果を基礎的に解明し、新しい重要な知見を得ており、工学および関連産業に貢献するところが大きい。

本論文に関し、調査委員らから、細胞増殖・分化の数学的モデルの適用範囲、実験・解析方法、凍結・融解後の神経突起の形態変化と細胞損傷の機序、今後の研究課題の具体性・発展性などについて質問がなされたが、いずれも著者から満足な回答が得られた。また、公聴会においても、多数の出席者があり種々の質問がなされたが、いずれも著者の説明によって質問者の理解が得られた。

以上により、論文調査及び最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が、博士（工学）の学位に十分値するものであると判断した。